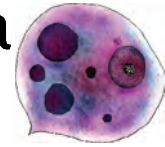


# Entamoeba histolytica:

## la estructura interna de un destructor por naturaleza



Bibiana Chávez Munguía y Arturo González Robles



La investigación de *Entamoeba histolytica* comenzó cuando el parásito fue identificado en muestras de heces y en tejidos humanos infectados, lo que permitió hacer una detallada descripción de sus componentes. Se logró entonces estudiar su morfología y la estructura interna de sus dos etapas biológicas: la amiba o trofozoíto y el quiste.

**E**ntamoeba *histolytica*, causante de la amibiasis invasora humana, es un organismo unicelular con ciclo de vida bifásico; es decir, presenta dos etapas biológicas en las cuales su forma es diferente.

Una de ellas es el trofozoíto, comúnmente llamado amiba, que habita, se nutre y multiplica dentro del intestino del hospedero humano, y es capaz de destruir cualquier tipo de célula y casi cualquier tejido.

La otra es el quiste, que asegura la persistencia del parásito en el ambiente externo y es la forma responsable de iniciar la infección en nuevos hospederos cuando los quistes son ingeridos al consumir agua o alimentos contaminados con ellos.

Numerosos estudios han analizado la estructura de las dos formas de este parásito. Por ser tan pequeño, su análisis ha requerido el uso de diversos tipos de microscopios. Desde que se identificaron tanto las amibas como los quistes, una pregunta importante ha sido, ¿cómo es que este organismo causa daño a su hospedero? La investigación comenzó identificando al parásito en muestras de heces y en tejidos humanos infectados, y observando las muestras por microscopía, lo que permitió hacer una descripción detallada de sus componentes que se pudieron identificar por su morfología y se compararon con aquellos ya caracterizados en otras células. Se logró así obtener una visión de la estructura interna tanto de los trofozoítos como de los quistes. Una sorpresa fue descubrir que las amibas presentan pocas estructuras y organelos celulares, pero tienen una gran cantidad de vacuolas de



diferente tamaño y un núcleo bien definido. Sin embargo, cuando fue posible utilizar el microscopio electrónico para analizar amibas fijadas químicamente y deshidratadas con disolventes, se logró un adelanto importante en identificar otras estructuras y apreciar mejor aquellas que se habían descrito con microscopios de menor resolución.

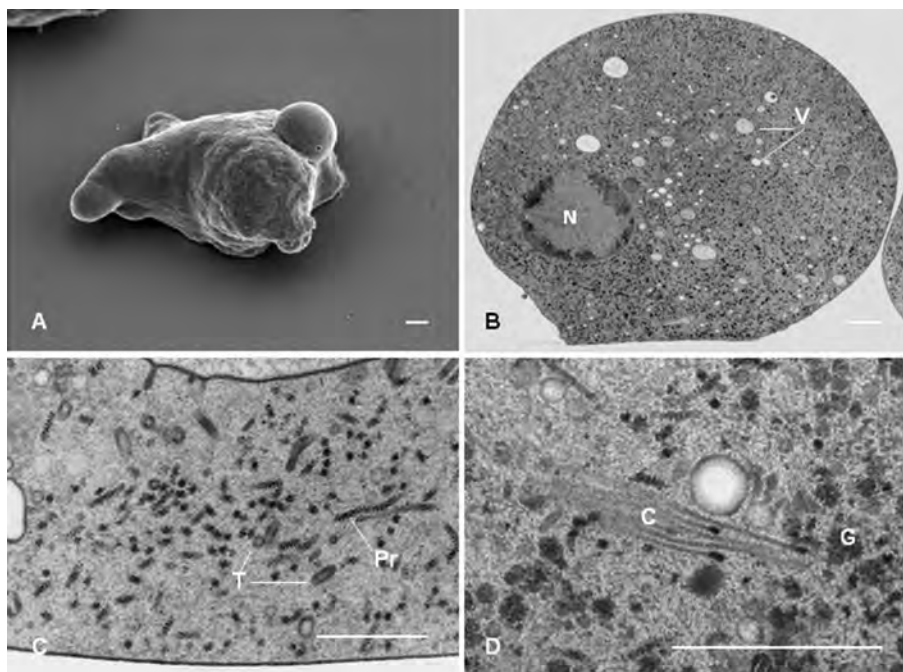
El inconveniente de estos métodos de preparación es que se pueden crear artificios, y eventualmente algunos componentes citoplásmicos pueden desaparecer. Por el contrario, la fijación mediante congelación ultrarrápida, seguida de deshidratación a muy baja temperatura, aumenta la posibilidad de una mejor preservación de la estructura biológica.

En este artículo se muestran imágenes obtenidas con estas técnicas que han permitido apreciar y describir en forma muy precisa la estructura interna de los trofozoítos y los quistes de este parásito. Estas metodologías, junto con los avances obtenidos a varios niveles que se examinan en otros artículos de este número de la revista, han permitido establecer la presencia de organelos cuya existencia se negaba hace apenas unos años, y

que permiten a las amibas sobrevivir e invadir los tejidos de su hospedero.

### ● Estructura del trofozoíto

El trofozoíto o amiba (Figura 1A) mide entre 20 y 40 micrómetros (1 micrómetro = 0.001 milímetros), es pleiomórfico, es decir, cambia su forma continuamente debido a la fluidez de su citoplasma, a la plasticidad de su membrana plasmática y a la capacidad de reestructuración de ciertos organelos internos que en conjunto se conocen como el *citoesqueleto*. Estas características no sólo le permiten moverse y desplazarse eficientemente sobre cualquier superficie formando proyecciones del citoplasma llamadas *seudópodos*, sino que también son determinantes para su nutrición. Los *seudópodos* participan en la captura de alimento mediante los mecanismos celulares conocidos como *pinoctosis*, para ingerir líquidos, y *fagocitosis*, para capturar sólidos. Estas propiedades permiten a los trofozoítos una gran motilidad y desplazamiento, lo cual, aunado a un alto contenido de enzimas proteolíticas (que des-



**Figura 1.** Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. **A)** Trofozoíto observado a través del microscopio electrónico de barrido. Fotos B a D: microscopía electrónica de transmisión. **B)** Corte fino de un trofozoíto en el que se aprecia el núcleo (N) y algunas vacuolas (V). **C)** Numerosos polirribosomas (Pr) y perfiles de delgados túbulos citoplasmáticos (T). **D)** Numerosos gránulos de glucógeno (G) y un grupo de cisternas aplanadas (C) similares al Golgi. Barra = 1 micrómetro.

truyen proteínas) en la membrana y el citoplasma, confieren al parásito un sorprendente potencial invasivo. Varios estudios de biología celular y molecular han demostrado que estos procesos son determinantes en el daño que ocasionan las amibas a los tejidos del hospedero.

Los trofozoítos presentan un núcleo esférico (Figura 1B) que mide de 4 a 7 micrómetros de diámetro. A diferencia de otras células que tienen un núcleo bien formado (eucariontes), en la periferia del núcleo de las amibas se localiza el ácido ribonucleico (ARN, ácido nucleico que lleva la información genética del núcleo a la maquinaria celular que fabrica proteínas), mientras que el ácido desoxirribonucleico (ADN), que constituye el material genético, se encuentra en posición central y aparentemente no se forman cromosomas típicos.

Dentro del núcleo es frecuente observar un número variable de pequeñas esferas que al microscopio de luz se observan refringentes, miden de 0.2 a 0.5 micrómetros de diámetro y son denominadas *esférulas nucleares*. Su función aún se desconoce. En cultivos de este parásito, que es la forma en que se mantiene regularmente a las amibas para su estudio en el laboratorio, pueden observarse con frecuencia dos o más núcleos; no obstante, en condiciones naturales el trofozoíto tiene sólo un núcleo.

El citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica* presenta numerosas vacuolas limitadas por una membrana que tiene características moleculares muy específicas para su función en el transporte de diversos materiales que se internalizan durante los mecanismos llamados fagocitosis, pinocitosis o por la fusión de varias vacuolas. También se encuentran abundantes gránulos de glucógeno y numerosos agregados en forma de bastón formados por ribosomas dispuestos helicoidalmente, en donde se lleva a cabo la síntesis de las proteínas.

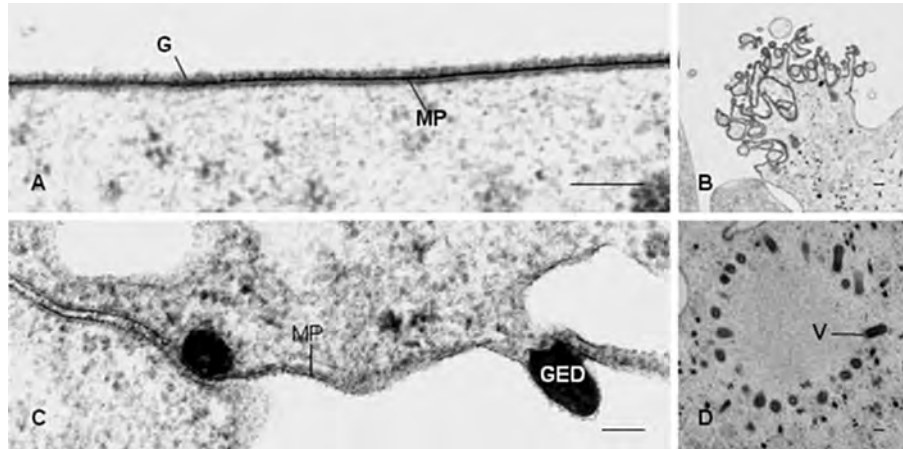
En estudios realizados en amibas fijadas químicamente no se habían podido identificar los organelos celulares presentes en la mayoría de las células, como mitocondrias, retículo endoplásmico y sistema de Golgi. Estos resultados eran sorprendentes, pues los estudios de biología molecular han identificado en las amibas a algunas de las proteínas que participan en funciones características de las citadas estructuras. Por ello, se esperaba que estuvieran presentes para llevar a cabo



estas funciones. La congelación ultrarrápida ha permitido identificar un sistema de pequeños canalículos que podría corresponder a un retículo endoplásmico liso (Figura 1C). También se han identificado grupos de cisternas aplanadas muy similares al Golgi (Figura 1D). Estos datos hacen pensar que tales organelos sí existen en las amibas, pero que son particularmente sensibles a las técnicas de fijación química usadas comúnmente.

Una de las estructuras que más se ha estudiado utilizando varias metodologías es la membrana plasmática que limita a cada amiba. Aunque la composición molecular es muy semejante a la de las membranas plasmáticas de otras células, los lípidos que la forman son específicos para el parásito, y se encuentran receptores y otras moléculas involucradas en la adhesión de las amibas a células blanco y a sustratos proteicos para su destrucción.

La membrana tiene un espesor de aproximadamente 10 nanómetros (un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro), y para poder observarla se requiere hacer cortes transversales del cuerpo de la amiba y utilizar una amplificación alta (30 000 veces). En estas condiciones se observa como una línea doble (Figura 2A). En especímenes criofijados y criosustituidos la superficie externa de la membrana plasmática muestra una capa muy fina de apariencia aterciopelada. Esta capa es la cubierta celular, llamada también *glicocálix*, constituida por carbohidratos que forman complejos con las proteínas que se han integrado a esta membrana, como los receptores.



**Figura 2.** **A)** Membrana plasmática (MP) con el glicocálix (G). **B)** Casquete. **C)** Sobre la cara interna de la membrana plasmática (MP) del trofozoíto se observan dos gránulos electrondensos (GED). Uno de ellos ocupa una proyección de la membrana. **D)** Grupo de virus (V) formando una roseta circular en el citoplasma. Barra = 100 nanómetros.

La fluidez de la membrana plasmática de las amibas, dada por sus componentes lipídicos, permite una gran movilidad de estos componentes en el plano de la membrana, y su translación a diferentes regiones de la misma como respuesta a un estímulo o señal del exterior. Esto sucede cuando la amiba se desplaza en una dirección definida y el movimiento requiere la polarización de componentes en la parte posterior del cuerpo para impulsar el citoplasma hacia el frente. Este procedimiento permite a las amibas dirigirse hacia moléculas o células que las atraen y llegar a sitios definidos en el organismo hospedero para poder invadir sus tejidos.

Otra acción muy característica de las amibas es la formación de un casquete membranar, en el cual moléculas ancladas a la membrana tanto por la parte extracelular como por la parte interna se concentran en la parte posterior del trofozoíto, de donde se desprenden. Se considera que este proceso ayuda a las amibas a escapar de la respuesta inmunitaria del hospedero, al librarse de los anticuerpos que se hubiesen generado contra moléculas amibianas y que se han logrado unir a la superficie del parásito. La formación del casquete ayuda también a las amibas a desprenderse de moléculas que pudieran dañarlas (Figura 2B).

En la cara interna de la membrana plasmática frecuentemente se observan pequeños gránulos a los que, por su apariencia oscura cuando son vistos a través del microscopio electrónico de transmisión, se les llamó

“gránulos electrondensos” (Figura 2C). Miden de 10 a 200 nanómetros de diámetro y pueden encontrarse dispersos en el citoplasma o asociados a la cara interna de la membrana plasmática. En ellos se han identificado moléculas con actividad proteolítica, como las enzimas colagenasa y gelatinasa. Se ha demostrado que estos gránulos se desprenden de la membrana y salen al exterior cuando las amibas interactúan con células en cultivo o con proteínas de la matriz que rodea y sostiene a los tejidos en el organismo hospedero. Se ha propuesto que algunas de las enzimas que las amibas utilizan para destruir células y para abrirse camino dentro de los tejidos del huésped están contenidas en estos gránulos.

En los trofozoítos es frecuente observar estructuras con una morfología que se asemeja a partículas virales de diferentes tipos cuando éstas son observadas a través del microscopio electrónico. Estas estructuras pueden encontrarse aisladas o formando grupos circulares (Figura 2D). Su identidad y su posible función en los trofozoítos se desconocen, aunque se ha especulado sobre la posibilidad de que fuesen partículas virales que infectan a las amibas y que podrían destruirlas. Ésta es una posibilidad muy interesante, ya que se podrían utilizar estos virus como vectores para acarrear genes letales al interior de las amibas mediante métodos de biología molecular. Al expresarse las proteínas letales codificadas en estos genes, las amibas morirían. Sin embargo, esta posibilidad no se ha estudiado a fondo.

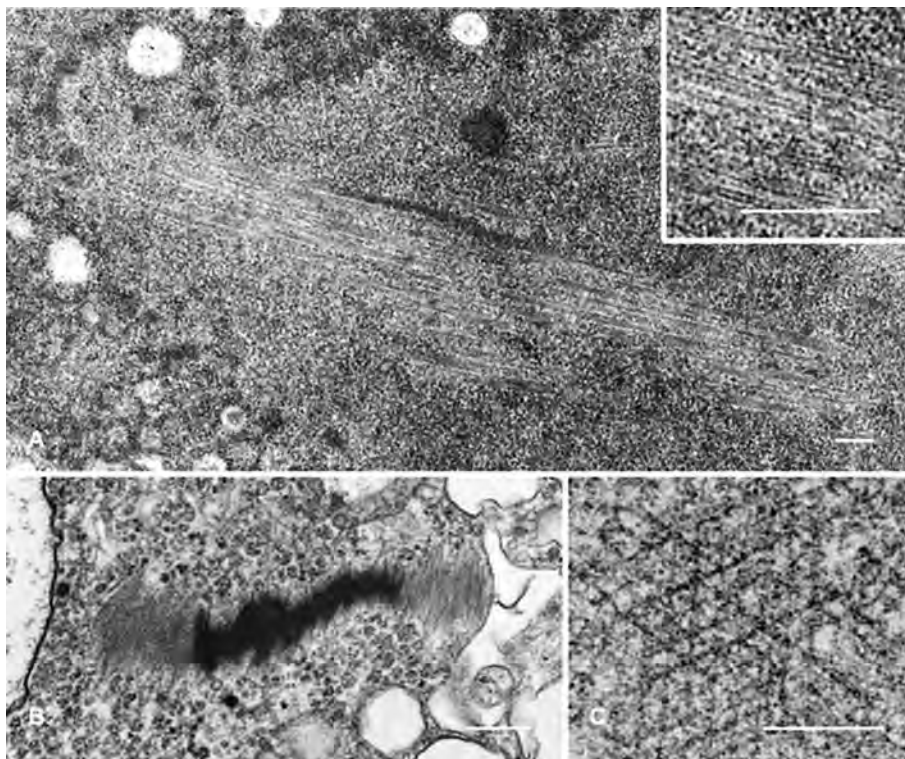
En células eucariontes en general, el complejo estructural llamado *citoesqueleto* se encuentra formado principalmente por actina (proteína que forma estructuras fibrilares en el citoplasma), así como por miosina (otra proteína fibrilar que se asocia con actina y otras moléculas para producir movimiento) y por tubulina (proteína que forma microtúbulos). Como se mencionó previamente, el citoesqueleto es un elemento directamente relacionado con la capacidad motriz e invasiva de los trofozoítos. En este parásito se han identificado ya los genes que codifican a varias formas de estas tres proteínas, y se conoce mucho sobre cómo se regula la síntesis de muchas de ellas.

También se han identificado varias de las proteínas que se asocian a la miosina y a la actina, y para regular diferentes funciones que dependen de la motilidad celular. Si bien los microtúbulos sólo han sido observados durante la mitosis formando un haz dentro del núcleo—pues a diferencia de otras células eucariontes, la mitosis en las amibas se lleva a cabo sin que se desorganice la membrana nuclear (Figura 3A)—, se han identificado

ya los genes correspondientes a diferentes formas de la tubulina. Es posible que los microtúbulos citoplásmicos sean particularmente sensibles a los fijadores, por lo que no se han podido observar.

Proteínas fibrilares como la actina y la miosina también interactúan y participan continuamente en la formación de estructuras transitorias como los pseudópodos y estructuras para la fagocitosis y la pinocitosis. Estas proteínas fibrilares participan además en la formación de las llamadas *placas de adhesión*, que son requeridas para que las amibas puedan adherirse al sustrato durante su desplazamiento, así como en la formación del casquete. Durante el proceso de división celular, la actina y la miosina intervienen también en la formación de un cinturón alrededor del cuerpo de la amiba que, al contraerse por la interacción de las dos proteínas, ayuda a la separación de las células hijas resultantes de la mitosis (Figura 3B).

La microscopía electrónica de transmisión ha permitido observar que en el cinturón contráctil la miosina y la actina presentan una organización similar a la que se



**Figura 3.** A) Núcleo en proceso de mitosis que muestra numerosos microtúbulos en corte longitudinal. Recuadro A, mayor aumento. B) Agregado fibrilar observado durante la división celular. C) Corte transversal de un agregado fibrilar. Barra = 20 nanómetros.

observa en las fibras musculares (Figura 3C). La organización y funciones de los elementos contráctiles en las amibas se consideran fundamentales para llevar a cabo sus actividades destructoras e invasoras, ya que se ha demostrado que las amibas que no expresan o que sobreexpresan estas proteínas en el citoplasma se comportan como no invasoras, debido a sus movimientos defectuosos.

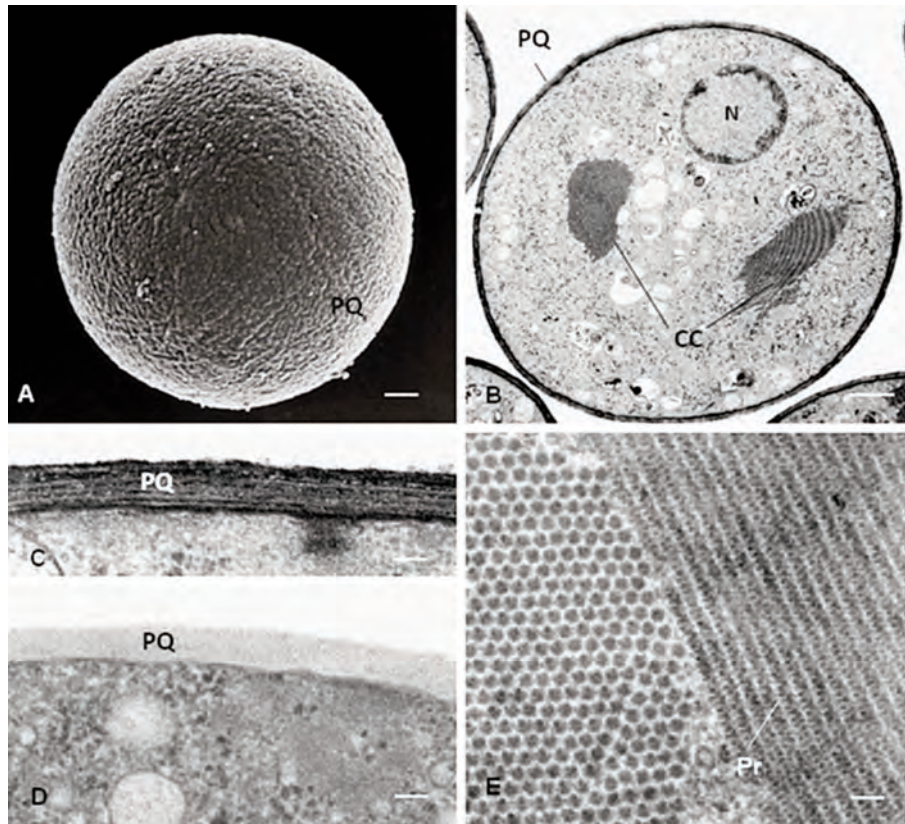
### ● Estructura del quiste

El quiste es la forma del parásito mediante la cual se disemina la infección. Por ello es muy resistente, ya que al ser arrojado al medio ambiente exterior tiene que sobrevivir en condiciones hostiles hasta encontrar un nuevo hospedero.

Los quistes son expulsados en gran número tanto por los pacientes con síntomas como por los individuos

que son portadores y no presentan una infección invasora. Ya en el exterior, pueden contaminar alimentos y agua que, al ser consumidos, reiniciarán la infección. En el tracto digestivo los jugos gástricos favorecen que los quistes se rompan, dando lugar a los trofozoítos que causan la sintomatología conocida de una infección amibiana.

Los quistes son completamente esféricos y miden de 10 a 20 micrómetros (Figura 4A). Durante el proceso de enquistamiento en el intestino grueso, en la superficie de la amiba se forma la pared del quiste. Esta gruesa capa lo protegerá de la desecación y de otras condiciones adversas cuando sea arrojado ya como quiste al medio ambiente. La pared es una capa fibrosa que mide de 120 a 150 nanómetros de espesor y cuyo principal componente es la *quitina*, un polímero de carbohidratos formado por unidades de N-acetil-D glucosamina.



**Figura 4.** A) Quistes de *Entamoeba histolytica*. Se observa la superficie rugosa de la pared del quiste por microscopía de barrido. B) En el citoplasma de un quiste tratado con rojo de rutenio se observan vacuolas, el núcleo (N), dos cuerpos cromatóides y la pared del quiste (PQ). Barra = 1 micrómetro. C) Cuerpos cromatóides a mayor ampliación, que muestran polirribosomas cortados transversal y longitudinalmente. D) y E) Pared del quiste (PQ) con rojo de rutenio (D) y sin rojo de rutenio (E). Barra = 100 nanómetros.

Tradicionalmente se consideró a la pared del quiste como una estructura impermeable que mantenía al parásito completamente aislado del medio exterior. Sin embargo, cuando los quistes son tratados con una solución que contiene un colorante denso a los electrones, la pared se observa oscura, por el paso del colorante al interior (Figura 4B, C), a diferencia de quistes no tratados con el colorante en los que la pared se observa casi transparente (Figura 4D). Este hecho demuestra que la pared del quiste es permeable al agua y a partículas muy pequeñas, lo que les permite mantener el mínimo de humedad e intercambio selectivo necesarios para su supervivencia en el exterior.

En el citoplasma del quiste (Figura 4B) se presentan de 1 a 4 núcleos, dependiendo de su estado de madurez. La población de vacuolas es notablemente menor que en los trofozoítos. Destacan también uno o varios agregados de polirribosomas dispuestos ordenadamente y de apariencia cristaloides, denominados *cuerpos cromatoides* (Figura 4E). Estos agregados no están limitados por una membrana y por su tamaño son fácilmente visibles en el microscopio óptico. Son considerados como un marcador característico de una infección amibiana cuando se hace un examen de las heces de un individuo con síntomas que sugieren esta condición.

Todos los estudios indican que los quistes sólo se forman en el ambiente del colon, para de ahí ser expulsados e iniciar la infección en nuevos hospederos, completando así su ciclo vital.

A pesar de la importancia del quiste en la diseminación de la amibiasis, aún se conoce muy poco sobre el proceso de enquistamiento. Una dificultad ha sido la carencia de un método para la producción masiva de quistes *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio), necesaria para hacer estudios bioquímicos y moleculares.

Un mejor conocimiento del quiste de *E. histolytica*, así como de los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, es uno de los retos por resolver, ya que al impedir la transmisión del parásito se podría avanzar rápidamente hacia el control de la amibiasis humana.

**Bibiana Chávez Munguía** es doctora en patología experimental por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), del que actualmente es profesora titular en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Utilizando microscopía electrónica estudia diversas parasitosis que afectan al ser humano, como la amibiasis y la giardiasis. Ha publicado numerosos artículos en revistas científicas de difusión internacional.

bchavez@cinvestav.mx

**Arturo González Robles** es doctor en patología experimental por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav). Es investigador titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Ha colaborado en numerosos proyectos de investigación relacionados con diversas infecciones que afectan al ser humano, producidas principalmente por protozoarios parásitos. Ha intervenido en la publicación de más de 70 artículos relacionados con el tema.

goroa@cinvestav.mx

### Lecturas recomendadas

- Chávez-Munguía, B., P. Talamás-Rohana, A. Ríos, M. González-Lázaro y A. Martínez-Palomo (2008), "Entamoeba Histolytica: Fibrillar Aggregates in Dividing Trophozoites", *Experimental Parasitology*, 118, 280-284.
- Chávez-Munguía, B., G. Castañón, V. Hernández-Ramírez, M. González-Lázaro, P. Talamás-Rohana y A. Martínez-Palomo (2012), "Entamoeba Histolytica Electrodense Granules Secretion in Vitro and in Vivo: Ultrastructural Study", *Microscopy Research and Technique*, 72, 189-196.
- Martínez Palomo, A. (1982), "The Biology of Entamoeba Histolytica", en Brown, K. N. (compilador), *Tropical Medicine Research Studies Series*, Chichester, Research Studies Press.
- Martínez-Palomo, A., A. González-Robles, B. Chávez, E. Orozco, S. Fernández-Castelo y A. Cervantes (1985), "Structural Bases of the Cytolytic Mechanisms of Entamoeba Histolytica", *Journal of Protozoology*, 32, 166-175.
- Meza, I., P. Talamás-Rohana y M. A. Vargas (2006), "The Cytoskeleton of Entamoeba Histolytica: Structure, Function and Regulation by Signaling Pathways", *Archives of Medical Research*, 37, 234-243.